|  |  |
| --- | --- |
| **Календулы лекарственной цветки, измельченные/  порошок для приготовления настоя*****Calendulae officinalis flores*** | **ФС** Вводитсявпервые |

Настоящая фармакопейная статья распространяется на Календулы лекарственной цветки, собранные в начале распускания трубчатых цветков и высушенные цветочные корзинки культивируемого однолетнего травянистого растения календулы лекарственной − *Calendula officinalis* L., cем. астровых – *Asteraceae*, применяемые в качестве лекарственного растительного препарата.

ПОДЛИННОСТЬ

***Внешние признаки*.** Анализ проводят в соответствии с требованиями ОФС "Цветки".

*Измельченный препарат.* Смесь кусочков цветоложа, язычковых, трубчатых цветков, листочков обвертки и их фрагментов, цветоносов, изредка кусочков недозрелых плодов проходящих сквозь сито с отверстиями размером 5 мм.

При просмотре под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны: кусочки цветоложа голые, часто с сохранившимися остатками обвертки по краю; язычковые цветки на верхушке трехзубчатые, обычно с оборванным трубчатым основанием; трубчатые цветки пятизубчатые, часто нераскрывшиеся (в виде бутонов); густоопушенные листочки обвертки серовато-зеленого цвета, узкие ланцетовидные с более светлой полосой по краю и слегка выступающей главной жилкой; цилиндрические кусочки цветоносов. Цвет язычковых цветков красновато-оранжевый, оранжевый, ярко-желтый или бледно-желтый; трубчатых цветков светло-желтый, желтый; листочков обвертки серовато-зеленый; незрелых плодов *–* зеленый, серовато-зеленый, желтовато-зеленый, желтовато-коричневый и коричневый; цветоложа – светло-серый, зеленовато- или коричневато-серый; цветоносов – серовато-зеленый.

Цвет измельченного препарата зеленовато-желтый с вкраплениями серовато-зеленого, красновато-оранжевого, оранжевого, светло-желтого, зеленого, желтовато-коричневого и коричневого цвета.

Запах слабый.

*Порошок*. Смесь частиц цветков, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм.

При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны: кусочки краевых язычковых цветков ланцетной формы с длинным отгибом, оранжевого или желтого цвета, с 3 зубчиками, с изогнутой коротко опушенной трубкой; цельные длинные (3–5 мм) трубчатые цветки, преимущественно их части, пятизубчатые, оранжево-желтого или желтого цвета; фрагменты сероватого цветоложа, кусочки густоопушенной обвертки зеленовато-серого цвета, с плотной темной срединной жилкой и пленчатым полупрозрачным краем, изредка кусочки плодов зеленого, серовато-зеленого, желтовато-зеленого, желтовато-коричневого и коричневого цвета; кусочки серовато-зеленых цветоносов, редко семена.

Цвет порошка зеленовато-желтый с вкраплениями серовато-зеленого, красновато-оранжевого, оранжевого, светло-желтого, зеленого, желтовато-коричневого и коричневого цвета.

Запах слабый.

***Микроскопические признаки.*** Анализ проводят в соответствии с требованиями ОФС «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов («Цветки»)».

*Измельченный препарат.* При рассмотрении микропрепарата язычковых цветков с поверхности должны быть видны удлиненные клетки эпидермиса с оранжевыми округлыми хромопластами и покрыты ярко выраженной кутикулой; с хорошо заметными мелкими друзами оксалата кальция в мезофилле цветка; на зубчиках эпидермис с сосочками, иногда с устьицами; трубка венчика густо опушена одно-, двухрядными волосками; завязь также опушена: с выпуклой стороны железистыми, по краям вогнутой стороны - простыми двухрядными волосками; фрагменты цветоложа с головчатыми волосками, их обломками или местами их прикрепления в виде 2 базальных тонкостенных клеток восьмеркообразной формы. Головка железистых волосков состоит из 2, 4 или 8 клеток. Эпидермис трубчатых цветков такой же, как у язычковых, но у зубчиков он с более вытянутыми сосочками; нижняя часть трубки венчика и завязь густо опушены одно-, двухрядными железистыми, реже двухрядными простыми волосками. Складчатость кутикулы, обычно маскируемая хромопластами, просматривается только на отдельных участках. Пыльца округлая и округло-трех-, четырехгранная шиповатая трех-четырехпоровая. Эпидермис листочков обвертки по краю представлен удлиненными клетками с прямыми стенками, в средней части - извилистыми стенками и устьицами, устьица аномоцитного типа; листочки обвертки густо опушены: по краю − длинными одно-, двухрядными простыми, двухрядными железистыми и ветвистыми волосками; в средней части − только железистыми волосками.

*Порошок.* При рассмотрении порошка должны быть видны: фрагменты эпидермиса язычковых и трубчатых цветков с удлиненными клетками и оранжевыми округлыми хромопластами; отдельные железистые волоски с двух-, четырех- или восьмиклеточной головкой и одно-, реже двухрядные простые волоски или их обломки; фрагменты тычиночных нитей, состоящих из почти квадратных клеток с утолщенными стенками; фрагменты эпидермиса густоопушенных листочков обвертки с прямыми или извилистыми стенками с устьицами и длинными одно-, двухрядными железистыми, простыми и ветвистыми волосками; мелкие друзы оксалата кальция в мезофилле; пыльца округлая и округло-трех-, четырехгранная шиповатая трех-четырехпоровая.



Рисунок – Календулы лекарственной цветки

1 – фрагмент эпидермиса завязи трубчатого цветка: а – простой многоклеточный двухрядный волосок, б – двухрядные железистые волоски (200×); 2 – фрагмент эпидермиса завязи язычкового цветка: а – железистый двухрядный волосок, б – железистый однорядный волосок (200×);3 – фрагмент эпидермиса листочка обвертки: а – устьица, б – 2-3-клеточные основания обломанных волосков (200×); 4 – фрагмент зубчика венчика трубчатого цветка: а – мелкие маслянистые капли в клетках мезофилла, б – сосочковидные выросты клеток эпидермиса (200×); 5 –фрагмент зубчика отгиба язычкового цветка: а – маслянистые капли в клетках мезофилла (200×); 6 –фрагмент отгиба язычкового цветка: а – маслянистые капли в клетках мезофилла, б – складчатость кутикулы эпидермиса (400×); 7 – округлые пыльцевые зерна с шиповатой экзиной и тремя порами (200×).

**Определение основных групп биологически активных веществ**

***1. Тонкослойная хроматография***

*Приготовление растворов.*

*Раствор стандартного образца (СО) рутина. Около* 0,005 г рутина (рутина тригидрата) растворяют в 10 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

*Раствор СО хлорогеновой кислоты.* Около 0,001 г хлорогеновой кислоты растворяют в 10 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

*Раствор СО кофейной кислоты.* Около 0,001 г кофейной кислоты растворяют в 10 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

*Раствор СО β-каротина.* Около 0,02 г СО β-каротина растворяют в 100 мл хлороформа и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

1. Около 1,0 г препарата, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 10 мл спирта 70 %, нагревают с обратным холодильником на водяной бане в течение 30 мин. После охлаждения до комнатной температуры извлечение фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 20 мкл испытуемого раствора и параллельно в одну полосу 5 мкл раствора СО рутина и по 10 мкл растворов СО хлорогеновой и кофейной кислот. Пластинку с нанесенными пробами сушат при комнатной температуре в течение 5 мин, помещают в камеру, предварительно насыщенную не менее 30 мин смесью растворителей муравьиная кислота безводная ‑ вода ‑ этилацетат (10:10:80) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей, выдерживают в сушильном шкафу при температуре 100 – 105 °С в течение 2 – 3 мин и еще теплую обрабатывают последовательно дифенилборной кислоты аминоэтилового эфира раствором 1% в спирте 96 % и макрогола 400 раствором спиртовым 5 %. Через 30 мин после обработки пластинку просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме растворов СО рутина, СО хлорогеновой кислоты и СО кофейной кислоты должны обнаруживаться: флуоресцирующая зона адсорбции желтого, желто-оранжевого или оранжевого цвета (рутин) и над ней зона адсорбции с флуоресценцией голубого цвета (хлорогеновая кислота), выше нее зона адсорбции с флуоресценцией голубого цвета (кофейная кислота).

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться:2 зоны адсорбции с желтой, зелено-желтой или коричнево-желтой флуоресценцией ниже и на уровне зоны адсорбции СО рутина; зоны адсорбции с голубой флуоресценцией на уровне зоны адсорбции СО хлорогеновой кислоты и на уровне зоны адсорбции СО кофейной кислоты; допускается обнаружение других зон адсорбции (фенольные соединения).

б) Около 1,0 г препарата, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, помещают в колбу вместимостью 50 мл, приливают 10 мл хлороформа, кипятят на водяной бане с обратным холодильником в течение 10 мин и охлаждают. Полученный раствор фильтруют через бумажный фильтр выпаривают на водяной бане досуха, затем растворяют в 1 мл хлороформа (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 30 мкл испытуемого раствора и 20 мкл раствора СО β-каротина. Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в хроматографическую камеру, предварительно насыщенную в течение 1 ч смесью растворителей гексан-бензол (85:15), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80–90% длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры и сушат до удаления следов растворителей, просматривают при дневном свете.

На хроматограмме раствора СО β-каротина должна обнаруживаться зона адсорбции желто-оранжевого цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться зона адсорбции желтого или желто-оранжевого цвета на уровне зоны адсорбции СО β ­каротина; допускается обнаружение дополнительных зон адсорбции

 желто­оранжевого цвета ниже уровня зоны СО β­каротина и зоны адсорбции на старте; допускается обнаружение других зон адсорбции (каротиноиды).

***2. Качественная реакция***

К 2 мл раствора А испытуемого раствор (см. раздел «Количественное определение») приливают 1 мл воды, затем осторожно по стенке прибавляют 1 мл ванилина раствора в серной кислоте, на границе слоев должно наблюдаться образование окрашивания красновато-коричневого цвета в виде кольца (тритерпеновые соединения).

ИСПЫТАНИЯ

**Влажность.** *Измельченный препарат, порошок* **−** не более 14 %.

 В соответствии с требованиями ОФС «Определение влажности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

**Зола общая.** *Измельченный препарат, порошок  -* не более 11 %. В соответствии с требованиями ОФС «Зола общая».

**Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте.** *Измельченный препарат, порошок –* не более 5 %. В соответствии с требованиями ОФС «Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте».

**Измельченность.** *Измельченный препарат:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 5 мм, − не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, − не более 5 %. *Порошок:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, − не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, − не более 5 %.

**Посторонние примеси**

В соответствии с требованиями ОФС «Определение подлинности, измельченности и содержания примесей в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

***Сырье, изменившее окраску (потемневшее и почерневшее).*** *Измельченный препарат -* не более 3 %.

***Другие части растения (кусочки стеблей, листьев).*** *Измельченный препарат -* не более 3 %.

***Органическая примесь.*** *Измельченный препарат* **−** не более 0,5 %.

***Минеральная примесь*.** *Измельченный препарат, порошок –* не более 0,5 %.

**Тяжелые металлы и мышьяк.** В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

**Радионуклиды.** В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

**Остаточные количества пестицидов**. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

**Зараженность вредителями запасов.** В соответствии с требованиями ОФС «Определение степени зараженности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов вредителями запасов».

**Масса содержимого упаковки.** В соответствии с требованиями ОФС «Отбор проб лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

**Микробиологическая чистота.** В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

**Количественное определение.***Измельченный препарат, порошок*: сумма флавоноидов в пересчете на рутин − не менее 1 %; экстрактивных веществ, извлекаемых водой, − не менее 35 %.

***Сумма флавоноидов***

*Приготовление растворов.*

*Раствор СО рутина.* Около 0,05 г (точная навеска) рутина помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и растворяют при нагревании на водяной бане в 85 мл спирта 96 %, охлаждают, доводят объем раствора тем же спиртом до метки и перемешивают (раствор А СО рутина). Срок годности раствора не более 1 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

1,0 мл раствора А СО рутина, 0,1 мл уксусной кислоты, 5 мл алюминия хлорида спиртового раствора 2 %, помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят спиртом 96 % до метки (раствор Б СО рутина). Срок годности раствора не более 1 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Аналитическую пробу препарата измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного препарата помещают в коническую колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 50 мл спирта 70 %, взвешивают с погрешностью ± 0,01 г и оставляют на 1 ч. Затем колбу присоединяют к обратному холодильнику, нагревают на водяной бане, поддерживая слабое кипение в течение 2 ч. После охлаждения колбу с содержимым вновь закрывают той же пробкой, взвешивают и содержимое колбы при необходимости восполняют растворителем. Содержимое колбы тщательно взбалтывают и фильтруют через сухой бумажный фильтр, отбрасывая первые 20 мл (раствор А испытуемого раствора).

1,0 мл раствора А испытуемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 5 мл алюминия хлорида спиртового раствора 2 % и 0,1 мл уксусной кислоты, доводят объем раствора спиртом
96 % до метки и перемешивают (раствор Б испытуемый раствор).

Оптическую плотность раствора Б испытуемого раствора измеряют через 40 мин на спектрофотометре при длине волны 408 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно раствора сравнения. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1 мл раствора А испытуемого раствора, 0,1 мл уксусной кислоты, доведенный спиртом 96 %до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б СО рутина в таких же условиях. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1,0 мл раствора А СО рутина, 0,1 мл уксусной кислоты раствора, доведенный спиртом 96 %до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин и абсолютно сухой препарат в процентах (*Х*) вычисляют по формуле:

$$X= \frac{A ∙50 ∙25 ∙ a\_{0} ∙1 ∙P ∙100∙100}{A\_{0} ∙a ∙1 ∙100 ∙25 ∙100 ∙\left(100-W\right)}= \frac{A ∙ a\_{0} ∙P ∙50}{A\_{0} ∙a∙\left(100-W\right)},$$

где *А* − оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;

*Ао* − оптическая плотность раствора Б СО рутина;

*а* – навеска препарата, г;

*ао*− навеска СО рутина, г;

*Р* – содержание основного вещества в СО рутина, %;

*W*−влажность сырья, %.

***Экстрактивные вещества****.* В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 1, экстрагент – вода).

**Упаковка, маркировка и транспортирование**. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

**Хранение.** В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».